

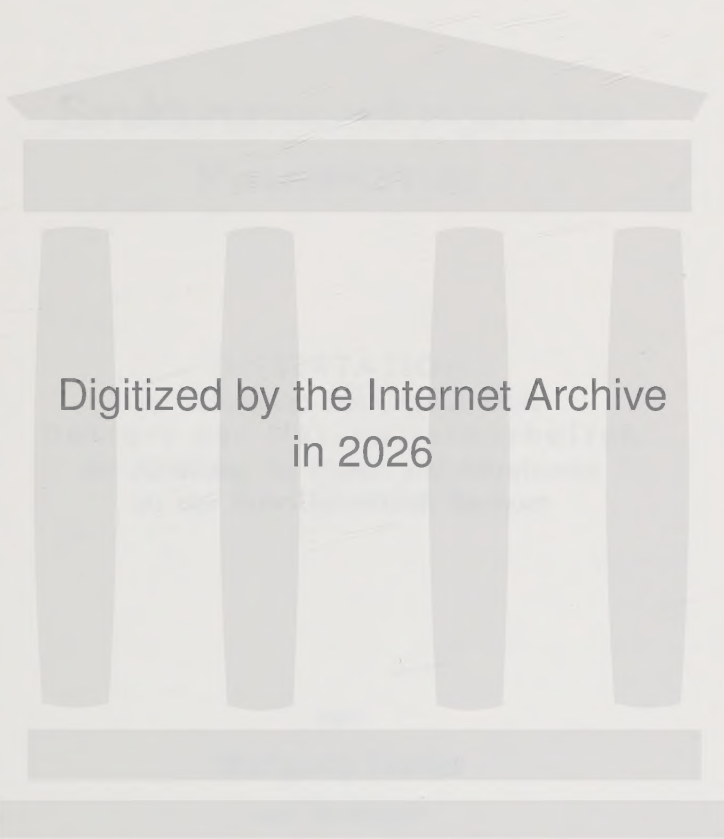
Aus dem Max-Planck-Institut
für Ernährungsphysiologie, Dortmund
Direktor: Professor Dr. B. Hess

Strukturumwandlungen von Pyruvatkinase

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Physik und Astronomie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Wolfgang Doster
aus Stuttgart

Bochum 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Max-Planck-Institut
für Ernährungsphysiologie, Dortmund
Direktor: Professor Dr. B. Hess

Strukturumwandlungen von Pyruvatkinase

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Physik und Astronomie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Wolfgang Doster
aus Stuttgart

Bochum 1979



Dissertation eingereicht am: 4.4.79

Tag der mündlichen Prüfung: 13.6.79

Referent: Professor Dr. B. Hess

Korreferent: Professor Dr. A. Redhardt

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methoden	5
1 Laserlichtstreuung	5
1.1 Die mittlere Streuintensität I_0	7
1.2 Intensitätsfluktuationen und Photonenkorrelationsspektroskopie	8
1.3 Photonen-zählung und digitaler Korrelator	9
1.4 Auswertung der Korrelationsfunktion	14
1.5 Probenpräparation	17
1.6 Fluoreszenzmessungen	17
1.7 Zirkulardichroismus	18
1.8 Enzymaktivität	18
1.9 Materialien	19
III. Hydrodynamische Daten der nativen Proteine	20
IV. Ergebnisse und Diskussion	23
1 Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel	23
1.1 Elastische Lichtstreuung	23
1.2 Quasielastische Lichtstreuung	25
1.3 Zirkulardichroismus	29
1.4 Fluoreszenz	29
1.5 Enzymaktivität	33
2. Hefepyruvatkinase	35
V. Thermodynamisches Modell	39
1 Theorie	39
2 Ergebnisse	42
VI. Zusammenhang zwischen Struktur und Strukturumwandlungen	46
VII. Zusammenfassung	53

I. EINLEITUNG

Neuere Messungen der Kernresonanz an Proteinlösungen haben gezeigt (1,2), daß das statische Bild, wie es die Röntgenstreuung von Proteinkristallen vermittelt, erweitert werden muß durch die Kenntnis struktureller Fluktuationen. Diese Fragestellung hat das Interesse an stochastischen Theorien und Meßmethoden für biochemische Prozesse wesentlich angeregt. Eine eindrucksvolle Methode der Fluktuationsspektroskopie ist die dynamische Lichtstreuung (3). Damit kann man dynamische und strukturelle Informationen direkt aus dem Fluktuationsspektrum von Licht gewinnen, das z.B. an makromolekularen Lösungen gestreut wird.

Die Analyse des Streufeldes, das durch die Konzentrationsfluktuationen der Brown'schen Molekülbewegung entsteht, erlaubt eine schnelle und genaue Bestimmung der Diffusionskonstanten ohne makroskopische Störung des Systems wie bei der Relaxationsspektroskopie (4).

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Absicht begonnen zu prüfen, ob mit dieser Methode auch Assoziations-Dissoziationsfluktuationen oligomerer Proteine gemessen und Gleichgewichtskonstanten bestimmt werden können. Eine Prüfung der theoretischen Grundlagen und der experimentellen Befunde (5,6) führte zu folgendem Ergebnis:

Die zu untersuchenden Proteine sind unter physiologischen Bedingungen so stabil, daß die Fluktuationen keinen Beitrag zum Spektrum liefern.

In einem nächsten Schritt wurde deshalb die Gleichgewichtskonstante durch Veränderung des Lösungsmittels so verschoben, daß die assoziierten und dissoziierten Reaktionspartner in vergleichbaren Konzentrationen vorlagen.

Überraschenderweise wurde selbst jetzt kein Beitrag der

chemischen Fluktuation zum Streuspektrum gemessen.

Eine Erklärung dafür ist, daß sich bei der Reaktion die Diffusionskonstante und/oder die Polarisierbarkeit um weniger als 100% ändern, was als die Grenze der Nachweisbarkeit angesehen werden kann (5,6).

Hinzu kommt, daß die chemische Fluktuationsrate größer oder vergleichbar sein sollte mit der Fluktuationsrate der Diffusion. Auch dies ist, wie spätere kinetische Messungen gezeigt haben, bei den untersuchten Proteinen nicht der Fall. Ein eindeutiger Nachweis chemischer Fluktuationsraten mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung für Moleküle, die sehr viel kleiner als die Lichtwellenlänge sind, steht noch aus. (7,8).

Auf der anderen Seite ist aber eine sehr genaue Messung der Diffusionskonstanten über die Konzentrationsfluktuationen möglich.

Als Alternative bot sich deshalb an, die Dissoziation durch Variation des Lösungsmittels zu induzieren und die Gleichgewichtskonstanten aus den Übergangskurven der Diffusionskonstanten zu bestimmen. Dieses Verfahren verlangt allerdings eine Extrapolation auf physiologische Bedingungen. Zusätzlich gibt es jedoch einen Einblick in die Struktur- und Faltungsmechanismen des Proteins.

Eine Untersuchung dieser Art existiert bisher nur für das relativ einfache monomere Protein Lysozym (9,10).

Für diese Arbeit wurden zwei typische tetramere Enzyme Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel und Hefe ausgewählt. Hier spielen zusätzlich zu Faltung und Auffaltung auch Assoziation und Dissoziation und deren Wechselwirkung eine Rolle.

Pyruvatkinase katalysiert den irreversiblen Transfer einer Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat auf Adenosinphosphat. Der irreversible Schritt begründet ihre Schlüsselstellung als regulatorisches Enzym der glykolytischen Kette (11).

Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel gehört kinetisch zum sogenannten M-Typ und hat ein Molekulargewicht von 237 000 D. Das Hefeenzym gehört zum L-Typ und hat ein Molekulargewicht von 198 000 D.

Der L-Typ ist im Gegensatz zum M-Typ allosterisch (als Funktion der Phosphoenolpyruvat Konzentration) und durch Fruktosediphosphat aktivierbar (12). Kürzlich wurde jedoch gezeigt, daß auch das Muskelenzym (als Funktion der Adenosindiphosphat Konzentration) eine sigmoide Kinetik liefert und durch FDP aktivierbar ist (13).

Eine genaue Darstellung der biochemischen Daten ist in (14-17) zu finden. Pyruvatkinase kann durch Guanidinhydrochlorid oder Harnstoff reversibel dissoziiert werden. Dies wurde für die vorliegende Untersuchung ausgenutzt. Um die Strukturübergänge des Proteins genauer charakterisieren zu können, wurden parallel zur Diffusionskonstanten weitere Parameter gemessen:

Die mittlere Streuintensität, die direkt proportional zum Molekulargewicht und Assoziationszustand des Moleküls ist, der Zirkulardichroismus der 222 nm Linie, der ein Maß für den Helixgehalt des Moleküls liefert und die Tryptophanfluoreszenz des Proteins, die lokale Veränderungen in der Umgebung der Tryptophane registriert. Ebenso wurde die Enzymaktivität als Funktion der Guanidin- und Harnstoffkonzentration gemessen, um die Minimalstruktur der biochemischen Funktion zu bestimmen.

Mit Hilfe der Übergangskurven dieser Parameter wurden die strukturellen Intermediate charakterisiert. Ein thermodynamisches Modell konnte aufgestellt und Gleichgewichtskonstanten berechnet werden.

Schließlich konnte ein Zusammenhang hergestellt werden zwischen den beobachteten Strukturumwandlungen und der von Stammers und Muirhead bestimmten nativen Struktur des Proteins (18).

II METHODEN

1. Laserlichtstreuung

Gegenstand des Abschnitts ist die theoretische Abteilung von molekularen Parametern, die man aus dem Raleighspektrum erhalten kann, und die Beschreibung der experimentellen Technik.

Abb. 1 zeigt den prinzipiellen Aufbau des Spektrometers. Das polarisierte kohärente Licht (Wellenvektor $\underline{k}_0$, Feld $\underline{E}_0$) eines He Ne Lasers (Spectra Physics Mod. 125A) wird auf eine Proteidlösung (S) fokussiert, die durch ein Wasserbad (B) bei konstanter Temperatur gehalten wird.

Ein Photomultiplier wandelt das im Winkel θ gestreute Feld ($\underline{E}$; $\underline{k}$) in eine Sequenz von elektrischen Pulsen $n(t)$ um. Das Signal wird auf einen digitalen Korrelator (Malvern Molekular Analyzer System 4300) gegeben, der folgende zeitlichen Mittelwerte berechnet:

a) die mittlere Pulszahl $\overline{n(t)}$

b) die Korrelationsfunktion $G^2(t) = \overline{n(0) n_C(t)}$.

Die Korrelationszeit t_c wird dann mit Hilfe eines Computers berechnet:

$$t_c = \int_0^{\infty} t G^2(t) dt / \int_0^{\infty} G^2(t) dt \quad (1)$$

In der Frequenzdarstellung entspricht t_c der Linienbreite $\Delta \omega$ der Raleighlinie: $t_c = 1 / \Delta \omega$.

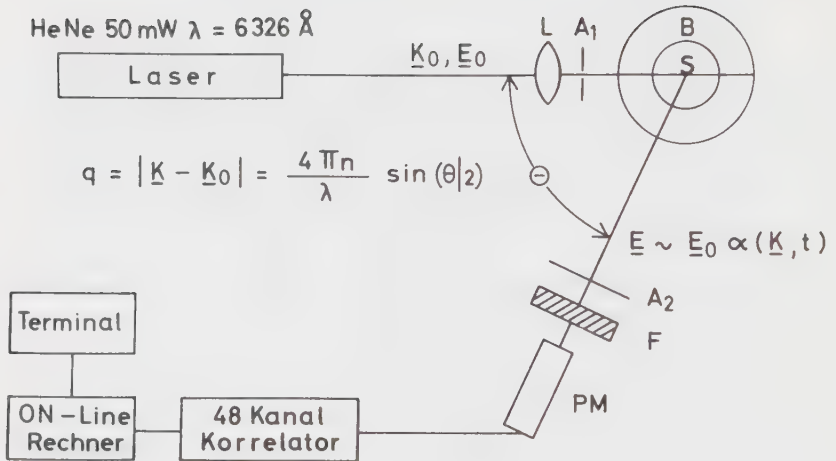


Abb. 1

Schematischer Aufbau des Laserstreuungsspektrometers:

(L) Linse zum Fokussieren des Lichtstrahls auf S,
 (A) Blende, (B) doppelt thermostatisiertes Wasserbad,
 das zirkulierende Wasser wird durch ein Filter staubfrei
 gehalten. (F) Interferenzfilter (632.6 nm), (PM) Photo-
 multiplifier (EMI 9816), (S) Streuzelle.

1.1 Die mittlere Streuintensität I_θ

Die von Einstein und Debye modifizierte Raleigh-Gans Gleichung für die Streuung von polarisiertem Licht an gelösten Teilchen, die sehr viel kleiner als die Lichtwellenlänge sind, ist gegeben durch (19):

$$\frac{I}{I_0} = \frac{2\pi n^2 (dn/dc)^2 c}{N \lambda^4 r^2 (1/M + 2BC + \dots)} \quad (2)$$

I_0 ist die Primärintensität, n der Brechungsindex der Lösung, c ist die Konzentration (g/l) und M das Molekulargewicht des Makromoleküls.

N ist die Loschmidtzahl, λ die Wellenlänge und r der Abstand des Detektors vom Streuvolumen. Da mit dieser Methode keine Absolutwerte des Molekulargewichts bestimmt wurden und die Proteinkonzentration klein war (1 mg/ml), wurde die Virialentwicklung im Nenner vernachlässigt. Gemessen wurde die mittlere Intensität I_m ($\theta = 90^\circ$) des Streulichts der Lösung, die das Protein in verschiedenen Zuständen i enthält, bezogen auf einen Referenzzustand o des Moleküls:

$$\frac{I_m}{I_o} = \frac{n^2 (dn/dc)^2 \sum c_i M_i}{n_o^2 (dn_o/dc_o)^2 c_o M_o} = K \frac{M_w}{M_o} \quad (3)$$

K ist eine optische Konstante und M_w ist das Gewichtsmittel. Die Brechungsindizes wurden mit einem Abbé-Refraktometer gemessen. Die Hintergrundstreuung des Lösungsmittels wurde abgezogen.

1.2 Intensitätsfluktuationen und Photonenkorrelations-spektroskopie

Das primäre Feld E_0 wird durch die Fluktuation des Streumediums moduliert.

Das sekundäre Feld E ist proportional zur Fluktuation der elektronischen Polarisierbarkeit des Mediums $\Delta\alpha$ (5):

$$E \sim \Delta\alpha(\underline{r}, t) \quad (4)$$

Die Polarisierbarkeit ist eine lokale Zustandsvariable und hat ein totales Differential:

$$\Delta\alpha = \sum_i \left(\frac{d\alpha}{dx_i} \right) \bar{x}_j x_i \quad (5)$$

Bei makromolekularen Lösungen sind die Konzentrationsfluktuationen Δc der Makromoleküle dominierend:

$$\Delta\alpha \cong \left(\frac{d\alpha}{dc} \right) \bar{x}_i \Delta c(\underline{r}, t) \quad (6)$$

Für die normierten zeitlichen Autokorrelationsfunktionen folgt dann:

$$g^1(\underline{r}, t) = \frac{\overline{\Delta\alpha(\underline{r}, 0) \Delta\alpha(\underline{r}, t)}}{\overline{\Delta\alpha^2}} = \frac{\overline{\Delta c(\underline{r}, 0) \Delta c(\underline{r}, t)}}{\overline{\Delta c^2}} \quad (7)$$

Die Konzentrationsfluktuationen genügen einer Diffusionsgleichung (Entropietransport)

$$\frac{d}{dt} \Delta c(\underline{r}, t) = D \nabla^2 \Delta c(\underline{r}, t) \quad (8)$$

oder

$$\frac{d}{dt} g^1(\underline{r}, t) = D \nabla^2 g^1(\underline{r}, t) \quad (9)$$

D ist der translatorische Diffusionskoeffizient.

Nach Fouriertransformation folgt:

$$g^1(q, t) = \exp(-q^2 D t) \quad (10)$$

$$q = |\underline{k} - \underline{k}_0| \quad (11)$$

Die Kombination von Gleichung (10) mit (7) und (4) ergibt für die Autokorrelationsfunktion des Streufeldes:

$$g^1(q, t) = \frac{\overline{E(0, q) E(t, q)}}{E^2} = \exp(-q^2 D t) \quad (12)$$

q folgt aus der Geometrie des Streuprozesses (Abb 1):

$$q = 4 \pi n \sin(\theta / 2) / \lambda \quad (13)$$

1.3 Photonen-zählung und digitaler Korrelator

Nach Gleichung (12) kann man die Diffusionskonstante aus der Korrelationsfunktion des optischen Feldes bestimmen. Photodetektoren aber messen keine Felder. Gemessen wird der Energiefluß $W(t) = I(t)A$, der auf eine Fläche A während eines Zeitintervalls T trifft und $n_T(t)$ Photoelektronen auslöst. Die Quantennatur des Meßprozesses impliziert eine zusätzliche Statistik: Bei kohärentem Licht ist die Photoemission ein Poissonprozess (20):

$$p(n_T) = \frac{1}{n!} (aI)^n \exp(-aI) \quad (14)$$

a ist die Quanteneffizienz.

Bei fluktuierender Lichtintensität mit der Verteilung $P(I)$ folgt aus (14)

$$p(n_T) = \int_0^\infty \frac{(aI)^n}{n!} \exp(-aI) P(I) dI \quad (15)$$

Eine Verallgemeinerung dieser Formel ist die bedingte, Wahrscheinlichkeit, daß man bei zwei unabhängigen Messungen, die um das Zeitintervall t verschoben sind, n und m Photoelektronen mißt:

$$p(n(t), n(0), T) = p(n, m, T) = \int_0^\infty \int_0^\infty \frac{\exp(-a(I+I'))}{n!m!} (aI)^n (aI')^m P(I, I') dI dI' \quad (16)$$

Eine unmittelbare Konsequenz der Formel (16) ist die Äquivalenz der normierten Korrelationsfunktionen des Photostroms und der Lichtintensität:

$$g^2(t, T) = \frac{\overline{n_T(0) n_T(t)}}{\overline{n_T}^2} = \frac{\overline{I(0) I(t)}}{\overline{I}^2} \quad (17)$$

Bei sehr vielen Streuzentren sind die Streuamplituden gaußverteilt. Das Feld ist vollständig beschrieben durch Mittelwert $\bar{I} = \overline{EE^+}$ und die Feldautokorrelationsfunktion $g^1(t, T)$. Die Intensitätsautokorrelationsfunktion $g^2(t, T)$ ist dann mit $g^1(t, T)$ über die Siegertrelation verknüpft:

$$g^2(t, T) = 1 + |g^1(t, T)|^2 \quad (18)$$

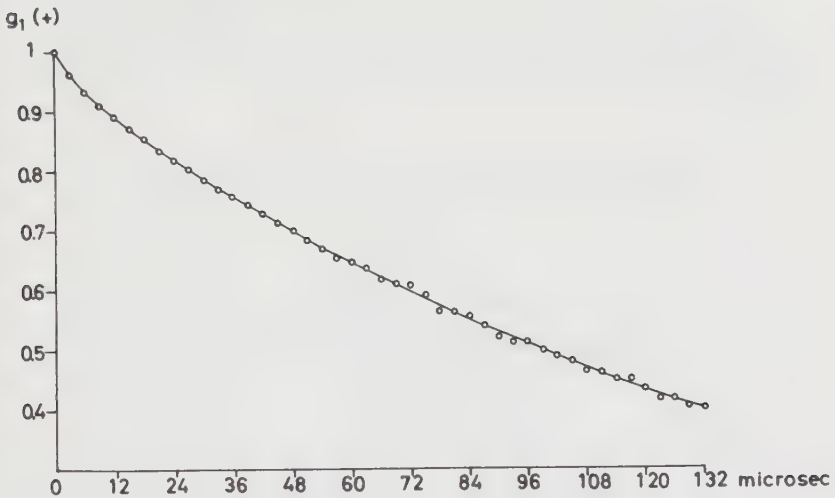


Abb. 2

Korrelationsfunktion und bimodaler Fit von Muskel-Pyruvat-kinase in 2,4 M Harnstoff und Phosphatpuffer, $T = 5^{\circ}\text{C}$,
 $\theta = 90^{\circ}$, $A_1 = 0,05$, $T_1 = 5 \text{ microsec.}$, $A_2 = 0,95$,
 $T_2 = 150,5 \text{ microsec.}$

Der verwendete 48 Kanal Malvern Korrelator berechnet eine digitale Approximation von $g^2(t)$, um zeitaufwendige Multiplikationen zu vermeiden: Die diskrete einfach geclippte Photonenkorrelationsfunktion mit Clip-level k ist definiert durch:

$$g_k^2(1T) = \frac{(\sum_j n(j) n_k(j+1)) / N}{(\sum_j n(j)) / N (\sum_j n_k(j)) / N} \quad (19)$$

Mit der Schwellwertbedingung:

$$\begin{aligned} n_k(j) &= 1 & n(j) &> k \\ n_k(j) &= 0 & n(j) &\leq k \end{aligned} \quad (20)$$

N ist die Anzahl der Zyklen, über die der Mittelwert gebildet wird. Für Gaußlicht gilt dann eine modifizierte Siegertgleichung:

$$g_k^2(t, T) \cong 1 + C_k / g^1(t)^2 \quad (21)$$

Der Informationsverlust durch die Clip-Prozedur ist bei $k = \bar{n}$ zu vernachlässigen. C_k ist eine experimentell zu optimierende Konstante, die vom Clipniveau, dem Signal zu Rauschverhältnis, und der Kohärenzfläche abhängt. Details über mögliche Verformung von g^1 wegen Laserinstabilitäten, Totzeit und Nachpulsen des Photomultipliers und Hintergrundstreuung sind von Oliver (21) ausführlich diskutiert worden:

1. Idealität der Lichtquelle

Für eine ideale kohärente Lichtquelle gilt:

$$P(I) = \delta(I - I_0) \quad (22)$$

Nach Gleichung (16) ist die Korrelationsfunktion flach:

$$G^2(t) = \overline{n^2} \quad (23)$$

Dies war für den He Ne Laser bei genügend großem Plasmastrom innerhalb der Varianz erfüllt.

Die Varianz der Korrelationsfunktion wird berechnet aus:

$$\text{Var } (G^2(t)) / \overline{G^2(t)} = \frac{2}{n} + \frac{1}{n^2} \quad (24)$$

2. Photomultiplier (EMI)

- a) Die Totzeit des PM erniedrigt die Zählrate des ersten Kanals. Sie muß bei Zählraten, die größer als 10^6 / sec. sind, berücksichtigt werden.
- b) Das Nachpulsen wird bei Zählraten, die kleiner sind als $0,1 \cdot 10^6$ / sec bemerkbar.
In diesem Zwischenbereich wurde durch Variation der Blende des PM gearbeitet.

3. Verformung der Korrelationsfunktion

- a) thermischer Laserdrift
Dieser Fehler wurde durch Mittelung vieler Messungen mit kurzer Meßzeit minimalisiert.

- b) Streulicht von den Zellwänden und Staubteilchen wirken als lokaler Oszillator und vergrößern die Korrelationszeit. Die Existenz von störendem Streulicht kann durch Messung der Winkelabhängigkeit der Korrelationszeit und der Streuintensität nachgewiesen werden.
 $1/t_c(q^2)$ sollte linear sein: Abb. (2).
Staub wird durch sorgfältiges Filtrieren entfernt (siehe 1.5).

- c) Normierung der Korrelationsfunktion

Die Normierung erfolgt über die ersten 3 Kanäle des Korrelators.

Um 1% Fehler der Korrelationszeit zu erhalten, muß die Normierung auf 0,3% genau sein. Bei den beschriebenen Messungen liegt der Fehler zwischen 0,1 bis 0,3% Abweichung.

- d) Kohärenzfläche

Die Amplitude C_k der Korrelationsfunktion wird wesentlich durch die Zahl der Kohärenzflächen bestimmt, über die wegen der endlichen Detektorfläche eine räumliche Mittelung erfolgt. Die Kohärenzfläche ist die Größe der Fläche, die vom Streuvolumen auf der Detektorfläche abgebildet wird und über die das Licht als kohärent betrachtet werden kann.

Es wurden zwischen fünf und zehn Kohärenzflächen abgebildet, was etwa 30 % der optimalen Amplitude ergab.

1.4 Auswertung der Korrelationsfunktion

Der an den Korrelator angeschlossene Computer (Interdata 716) optimiert die Parameter der folgenden Funktion:

$$C_k^{-1/2} (g_k^2 - 1)^{1/2} = g^1(t) = \sum_i A_i \exp(-q^2 D_i t) \quad (25)$$

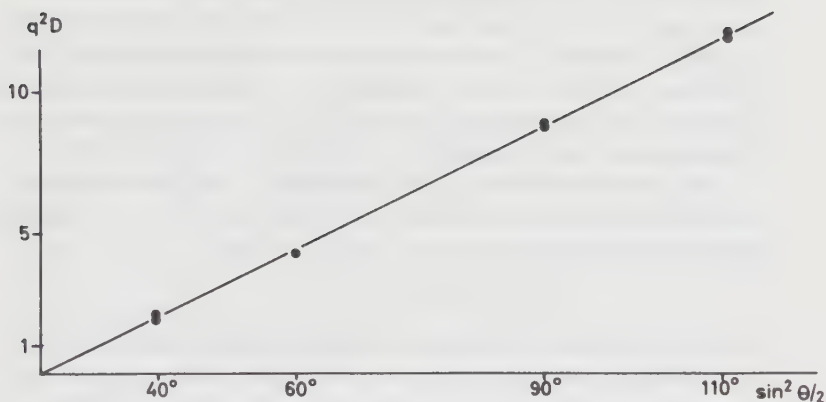


Abb. 3

Abhängigkeit der Korrelationsrate ($10^3/\text{sec}$) vom Streuwinkel: Hefe-Pyruvatkinase in Glycerinphosphatpuffer, $T = 5^\circ\text{C}$. Die lineare Abhängigkeit ist ein Test für die Abwesenheit von Hintergrundstreuung. Die Diffusionskonstante wird aus der Steigung des Geraden bestimmt.

Da die untersuchten Lösungen nur wenige diskrete Spezies i enthalten (paucidispers), wurde die Korrelationsfunktion als Summe von Exponentialfunktionen analysiert (Abb 3). Verwendet wurde das nichtlineare Fitprogramm Harwell Subroutine VC05A zusammen mit einem Anfangswertprogramm (Müller/Plessner). Die Meßwerte wurden proportional zu $g^1(t)$ gewichtet, wegen des mit wachsendem t zunehmenden statistischen Fehlers (4). Das untersuchte Spektrum enthielt nur die Komponenten des Lösungsmittels und des Proteins, deren Diffusionskoeffizienten so verschieden sind, daß eine bimodale Analyse vorgenommen werden konnte. Für die Diffusionskonstante von Guanidin wurde gemessen:

$$D_{20,W}^G = 70 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{s} \pm 20\%$$

in Übereinstimmung mit einer anderen Studie von Dubin (9).

Die verschiedenen Proteinzustände führten nicht zu einer Inhomogenität der Korrelationsfunktion, da deren Diffusionskoeffizienten um weniger als ein Faktor 2 verschieden sind (9). Pro Meßpunkt wurden 12 Korrelationsfunktionen bei variablem T und Streuwinkel gemittelt. Dies ergab einen Fehler für die Diffusionskonstante von 2%. Den hydrodynamischen Radius berechnet man aus der Stokes-Einstein Gleichung:

$$R_h = \frac{KT}{6\pi\eta D} \quad (26)$$

Die Viskosität des Lösungsmittels wurde mit einem Kugelfallviskosimeter (Höppler-System) gemessen. Die Proteinkonzentration lag zwischen 1 bis 2 mg/ml.

1.5 Probenpräparation

Voraussetzung für jedes Lichtstreuexperiment ist eine sorgfältige Entfernung unerwünschter Partikel, da alle Partikel unspezifisch streuen.

Die Reinheit der Proteinfraction wurde durch Mikrogelelektrophorese gezeigt.

Staubpartikel wurden durch eine Filtrierprozedur entfernt. Die Streuzelle wurde in Chromschwefelsäure gelagert, dann mehrmals in Alkohol gewaschen und schließlich etwa eine Stunde in einem geschlossenen Kreislauf mit filtriertem destilliertem Wasser gespült. In die getrocknete Zelle wurde dann das vorher zentrifugierte Protein durch ein 0,2/0,6 μm Milliporefilter gegeben.

Um Proteinaggregation zu vermeiden, wurde Glycerin dem Puffer zugesetzt und bei tiefen Temperaturen gemessen. Zur Minimalisierung der Hintergrundstreuung wurden quadratische Zellen verwendet.

1.6 Fluoreszenzmessungen

Das Fluoreszenzsignal wurde bei verschiedenen Pufferbedingungen als Funktion der Guanidinkonzentration mit einem Perkin-Elmer Spektrometer gemessen.

Die Proteinkonzentration lag bei 0,5 mg/ml. Pyruvatkinase (Kaninchenmuskel) enthält 3 Tryptophangruppen, die bei 290 nm absorbieren. Das Emissionsmaximum bei 340 nm wurde registriert. Jeder Meßpunkt ist ein Mittelwert aus 3 Messungen. Um die Stabilität des Signals zu prüfen, wurden Messungen nach einer Stunde, nach 6 und 24 Stunden durchgeführt. Zur Kontrolle wurde auch die Fluoreszenz des freien Tryptophans als Funktion der Guanidinkonzentration gemessen. Das Signal war konstant.

1.7 Zirkulardichroismus

Gemessen wurde die Elliptizität der 222nm Absorption der Peptidbindung mit einem CNRS-Roussel Jouan-Dichrograph. Die Meßpunkte sind Mittelwerte aus drei Meßreihen. Absolutwerte des Helixgehaltes wurden nicht berechnet, da diese modellabhängig sind. Zur Interpretation wird nur die relative Elliptizität $\theta/\theta_{\text{max}}$ herangezogen (22). Die Proteinkonzentration war 0.48 mg/ml und die Schichtdicke der Lösung betrug 1 mm.

1.8 Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wurde in einer gekoppelten Standardprozedur mit Lactatdehydrogenase unmittelbar nach Verdünnung aus der Guanidin oder Harnstofflösung gemessen. Alle Experimente wurden bei 5°C durchgeführt, da bei dieser Temperatur keine Reaktivierung beobachtet wird (15).

Die Standardbedingungen waren: 10 mM Kaliumphosphat, 10 mM ADP, 30 mM MgSO_4 , 10 mM Phosphoenolpyruvat, 0,3 mM NADH, 0,05 mg/ml LDH, pH 6.5.

Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 10 μ l Pyruvatkinase in Guanidin oder Harnstoff zu 2 ml Essaymedium. Die NADH Absorption wurde mit einem Eppendorff Photometer gemessen.

Da bei der Reaktion



ein Proton verbraucht wird, kann die Enzymaktivität auch mit dem pH-Stat gemessen werden. In diesem Fall wurde bei aktuellen Guanidinkonzentrationen ohne den Verdünnungsschritt gearbeitet. Die Proteinkonzentration betrug 5 Mikrogramm/ml. Die Standardbedingungen waren:

0.2 M KCl, 2 mM Kaliumphosphat, 10 mM Phosphoenolpyruvat (PEP), 10 mM Adenosindiphosphat (ADP), 30 mM MgSO_4 , 20 % Glycerin, pH 6.5, $T = 5^\circ\text{C}$.

1.9 Materialien

Ultrareines Guanidinhydrochlorid (GHCL) und Harnstoff von Serva Feinbiochemica wurden verwendet.

Die Konzentrationen wurden über den Berechnungsindex der Lösung mit einem Abbé Refraktometer bestimmt.

Kaninchenmuskelpyruvatkinase von Boehringer und Pyruvatkinase aus Bäckerhefe (eigene Präparation) wurden gegen 0.05 M Kaliumphosphat, 0.03 M Mercaptoäthanol, 20% Glycerin bei pH 6.5 und 0.1 M Tris HCL, 1 mM EDTA und 0.03 M Mercaptoäthanol bei pH 7 dialysiert.

Eine kleine Menge des konzentrierten Enzyms (10-15 mg/ml) wurde mit der entsprechenden Guanidin oder Harnstofflösung verdünnt und vor der Messung mindestens eine Stunde inkubiert.

III HYDRODYNAMISCHE DATEN DER NATIVEN PROTEINE

Die aus der Korrelationszeit berechneten Diffusionskonstanten können wegen der Protein-Proteinwechselwirkung noch von der Proteinkonzentration abhängen.

Abb. (4) zeigt, daß dies bei Muskel- und Hefepyruvatkinase in Glycerinphosphatpuffer nicht der Fall ist. Die Werte sind auf 20°C in Wasser korrigiert.

Die Sedimentationskoeffizienten wurden mit einer analytischen Ultrazentrifuge von Beckmann gemessen.

Das Molekulargewicht kann mit Hilfe der Svedberggleichung berechnet werden:

$$M = \frac{RT S_{20,w}^0}{D_{20,w}^0 (1 - \delta V_2)} \quad (27)$$

$S_{20,w}^0$, $D_{20,w}^0$ sind der Sedimentationskoeffizient und der Diffusionskoeffizient korrigiert auf 20°C in Wasser und verschwindende Proteinkonzentrationen (23). δ ist die Dichte des Lösungsmittels und V_2 ist das partielle spezifische Volumen des Proteins.

In Tabelle 1 sind die hydrodynamischen Daten der Muskel- und Hefepyruvatkinase zusammengestellt.

TABELLE I: HYDRODYNAMISCHE DATEN

a) Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel

$$D_{20,w}^0 = 3,90 (\pm 0,02) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{sec}$$

$$R_h = 55 (\pm 2) \text{ \AA}$$

$$S_{20,w}^0 = 9,98 (\pm 0,05) \text{ S}$$

$$M_{S/D} = 237\ 000 (\pm 4\ 000) \text{ D}$$

$$V_2 = 0,741 \text{ ml/g}$$

b) Pyruvatkinase aus Hefe

$$D_{20,w}^0 = 4,00 (\pm 0,02) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 / \text{sec}$$

$$R_h = 53 (\pm 2) \text{ \AA}$$

$$S_{20,w}^0 = 8,69 (\pm 0,05) \text{ S}$$

$$M_{S/D} = 198\ 000 (\pm 4000) \text{ D}$$

$$V_2 = 0,735 \text{ ml/g}$$

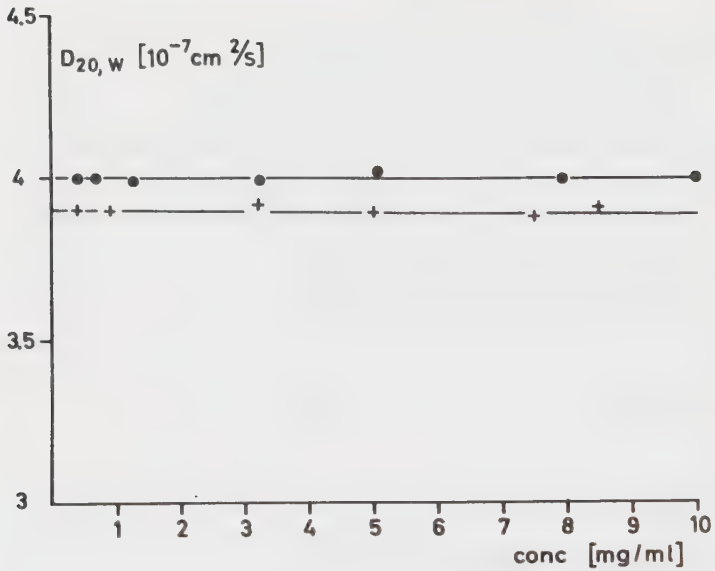


Abb. 4

Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionskonstanten in Glycerinphosphatpuffer: (●) Hefepyruvatkinase, (+) Mus-kelpyruvatkinase korrigiert auf 20°C in Wasser.

IV ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1 Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel

1.1 Elastische Lichtstreuung

Abb. 5 zeigt das Verhältnis der Streuintensität ($\theta = 90^\circ$). I_m von Pyruvatkinase in Guanidin zur Streuintensität I_o des Enzyms in reinem Puffer bei verschiedenen Temperaturen.

In reinem Puffer ist Pyruvatkinase ein Tetramer mit 4 identischen Untereinheiten (24).

Nach Gleichung (3) ist I_m/I_o ein direktes Maß für das Gewichtsmittel des Molekulargewichts des Proteins. Man sieht zwei scharfe, gut getrennte Übergänge bei 1.1 und 2.1 M Guanidin. Unter 0.9 M ist das Enzym ein Tetramer, über 2.4 M Guanidin ist es in monomere Einheiten dissoziiert. Zwischen beiden Übergängen existiert ein Plateau bei 50 % der ursprünglichen Streuintensität. Bei identischen Untereinheiten bedeutet das nach Gleichung (3) ein stabiles Dimer.

Variation der Pufferbedingungen und der Temperatur verschiebt die Übergangskurve nicht signifikant. Da höhere Temperaturen zufällige Aggregationen begünstigen, wurden die meisten Messungen bei 5°C gemacht.

Pyruvatkinase hat eine geschlossene Struktur mit vier identischen Untereinheiten. Ein stabiles Dimer existiert. Das bedeutet: das Enzym ist ein isologes Tetramer (18). Die Bindungsdomäne hat in diesem Fall zwei identische Bindungsflächen und eine zweizählige Symmetrieachse. Mindestens zwei verschiedene Bindungsenergien sind notwendig. Die Konsequenzen werden später mit Hilfe der Röntgenstruktur diskutiert.

Stabile Dimere werden auch bei anderen Enzymen wie Hämoglobin (27) gefunden. Im Gegensatz dazu dissoziieren Lactatdehydrogenase (28) und Aldolase (29) ohne stabiles Intermediat bei der Säuredenaturierung. Bei Denaturierung mit Guanidin allerdings zeigt Aldolase ebenfalls mehrere Übergänge (36).

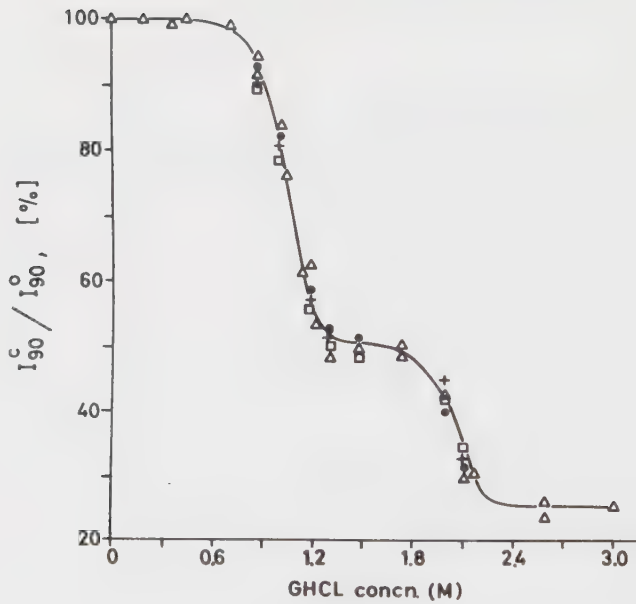


Abb. 5

Relative Streuintensität von Muskel-Pyruvatkinase in Glycerinphosphatpuffer, pH 6.5, bei verschiedenen Temperaturen: (Δ) 5°C, ($\bullet$) 10°C, (+) 15°C, ($\square$) 20°C.
(—) Theoretische Kurve berechnet aus Modell (30).

1.2 Quasielastische Lichtstreuung

Der hydrodynamische Radius, berechnet mit dem Diffusionskoeffizienten aus Gleichung (26), ist in Abb. 6 als Funktion der Guanidinkonzentration gezeigt. Zum Vergleich sind auch die relativen Streuintensitäten eingezeichnet.

Im Bereich der Dissoziation des Tetramers zwischen 1M und 1.5 M Guanidin steigt der Stokesradius von 55 Å auf 84 Å an. Man erwartet eigentlich das Gegenteil, da die Dissoziation des Tetramers in kompakte Dimere den mittleren Radius verringern sollte. Offenbar ist die Dissoziation mit Veränderungen der Tertiärstruktur verknüpft, die zu einer Expansion des Moleküls führen.

Nach einem Plateau nimmt der Stokesradius dann parallel zur Dissoziation von 84 Å auf 67 Å ab. Eine weitere Veränderung bei höheren Guanidinkonzentrationen wird nicht beobachtet. Mit diesen Werten kann das molare Reibungsverhältnis des Moleküls berechnet werden:

$$R_h/R_d = f/f_o ((v_2 + d)/v_2)^{1/3} \quad (28)$$

R_d ist der sogenannte Trockenradius:

$$R_d = (3Mv_2/4N)^{1/3} \quad (29)$$

f/f_o ist ein Gestaltfaktor, v_2 ist das partielle spezifische Volumen, M das Molekulargewicht, N die Avogadrozahl und d das Hydratisierungsvolumen des Proteins.

Das Tetramer hat ein Reibungsverhältnis von 1.34, beim expandierten Dimer erhält man 2.54. Das spezifische Volumen v_2 ändert sich gewöhnlich bei der Denaturierung um wenige Prozent (30). Um das Anwachsen von R_h/R_d allein durch Gestaltveränderung zu erklären, müßte ein Anwachsen des Achsenverhältnisses beim entsprechenden Rotationsellipsoid um den Faktor 20 angenommen werden (31).

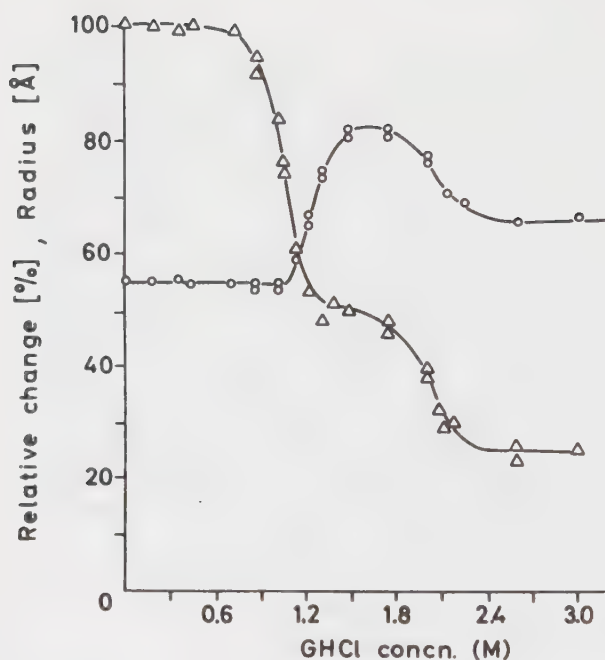


Abb. 6

Relative Streuintensität (Δ) und hydrodynamischer Radius (o) von Muskel-Pyruvatkinase in Glycerinphosphatpuffer bei pH 6.5 und 5°C. (—) Theoretische Kurve nach Modell (30).

Der Hauptbeitrag dürfte deshalb von der verstärkten Hydratisierung hydrophober Gruppen beim Auffalten des Proteins stammen.

Das Monomer hat fast das gleiche Reibungsverhältnis (2.55). Entweder sind Gestalt und Hydratisierung ähnlich wie beim Dimer, oder die Veränderungen kompensieren sich: Das Monomer ist symmetrischer und stärker hydratisiert. Der Stokesradius des Monomers ($67 \text{ \AA}$) entspricht dem eines Gaußknäuels mit einem Molekulargewicht von 60 000 D (32).

Dieselbe Kombination von elastischer und quasielastischer Lichtstreuung wurde in Gegenwart von Harnstoff durchgeführt. Abb. 7 zeigt den ersten Strukturübergang. Der zweite Übergang war wegen der Tendenz zur Aggregation in diesem Bereich schwer zu messen. Die Kurven sind zu höheren Konzentrationen hin verschoben, da Harnstoff eine schwächere Wirkung hat als Guanidin. Die Dissoziation des Tetramers ist ebenfalls mit einem Anwachsen des Stokesradius verknüpft.

Zusätzlich deutet jedoch eine geringe Abnahme des Stokesradius bei 2 M Harnstoff auf die Existenz einer kompakten dimeren Form des Moleküls. Erste kinetische Messungen zeigen, daß das kompakte Dimer als kinetisches Intermediat vor der Auffaltung auftritt. Die geringe Stabilität des kompakten Dimers führt zu dem Schluß, daß die native Struktur der Untereinheiten erst durch Assoziation zu einer oligomeren Einheit stabil wird.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Sedimentationsdaten von Deal und Steinmetz (24). Die Autoren beobachteten, daß das Tetramer (8,9 S) zwischen 1.7 und 2 M Harnstoff zunächst in ein 7.3 S Produkt zerfällt, das dann nach einigen Stunden in ein 3.6 S Produkt übergeht. Das Monomer in 7 M Harnstoff hat 2.01 S. Das 7.3 S Produkt wird als kompaktes

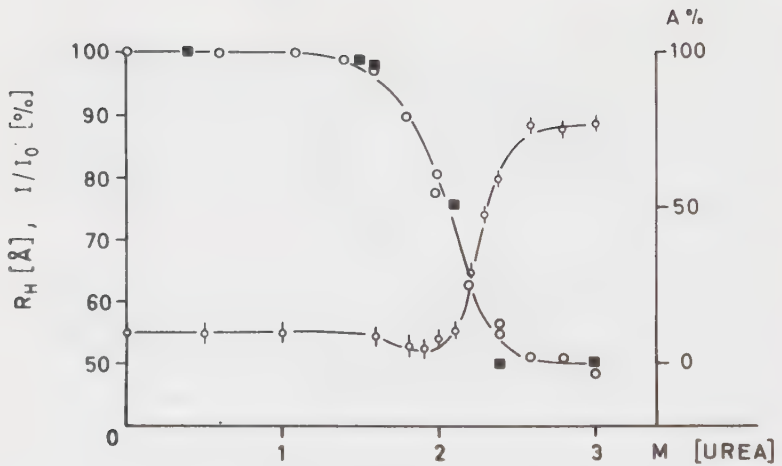


Abb. 7

Relative Streuintensität (O), hydrodynamischer Radius (◇), Enzymaktivität (■) von Muskelpyruvatkinase in Harnstoff, $T = 5^\circ\text{C}$. (—) Theoretische Kurve berechnet nach Modell (30).

Dimer interpretiert. Das 3.6 S Produkt soll entweder ein expandiertes Dimer oder ein kompaktes Monomer sein. Die mit der Lichtstreuung erhaltenen Daten sprechen eindeutig für ein aufgefaltetes Dimer.

Katalase ist ein ähnlicher Fall: Mit Hilfe der Neutronenstreuung wurde gezeigt, daß die Dimerisierung des Proteins zu einer Vergrößerung des Trägheitsradius führt (33).

1.3 Zirkulardichroismus

In Abb. 8 ist zusätzlich zu den Daten der Lichtstreuung das Maximum der Elliptizität bei 222 nm relativ zum Maximalwert eingetragen. Nach einem leichten Anstieg bei niedrigen Guanidinkonzentrationen fällt die Elliptizität oberhalb 1.1M stark ab parallel zur Expansion des Dimers. Die Übergangskurve ist assymetrisch. Dies deutet auf einen zweiten Prozess im Bereich der Dimer-Monomerdissoziation.

Der Helixgehalt des Moleküls wird offenbar ebenfalls in zwei Schritten abgebaut. Der größere Teil der Sekundärstruktur geht allerdings schon bei der Auffaltung des Dimers verloren.

1.4 Fluoreszenz

Die Fluoreszenzmessungen wurden ebenfalls in Phosphat und Trispuffer durchgeführt. Im Gegensatz zu Lichtstreuung und Zirkulardichroismus waren die Ergebnisse verschieden.

In Tris Puffer beobachtet man deutlich einen Anstieg der Fluoreszenzemission (340 nm) bevor das Molekül dissoziiert.

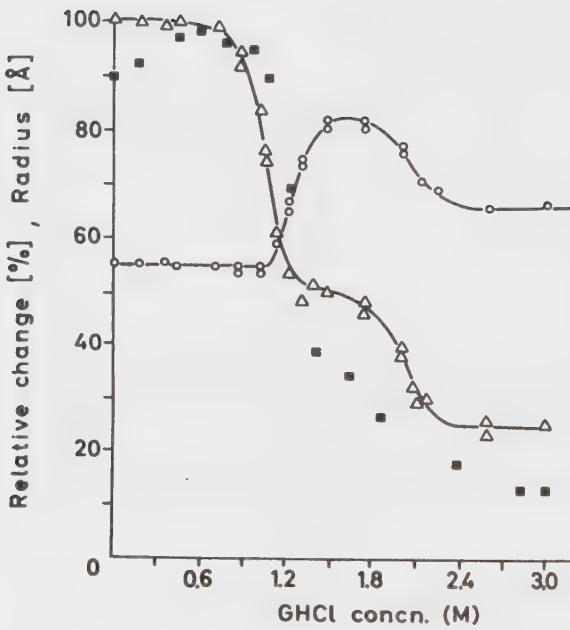


Abb. 8

Relative Streuintensität (Δ), Hydrodynamischer Radius ($\circ$),
und relative Elliptizität ($\blacksquare$) von Muskelpyruvatkinase
in Glycerinphosphatpuffer bei pH 6.5 und 5°C.
(—) Theoretische Kurve berechnet nach Modell (30).

Parallel zur Dissoziation fällt das Signal wieder stark ab: Abb. 9.

In Phosphatpuffer wird dasselbe Phänomen registriert, jedoch ist das Signal nicht stabil. Nach einer Stunde Inkubation in Guanidin erhält man kontinuierlich abfallende Werte, die in Abb. 9 zu sehen sind. Die Stabilität der Zustände ist offenbar in beiden Puffern verschieden. Das Ansteigen der Proteinfluoreszenz bei niedrigen Guanidinkonzentrationen gibt einen Hinweis auf die Flexibilität der nativen Struktur.

Das bedeutet, daß der native Zustand möglicherweise durch eine Verteilung von Konformationen beschrieben werden muß. Eine endliche Breite der Verteilung zeigt, daß das Energieminimum des nativen Zustands relativ flach ist. Nach einem Modell von Kanehisa und Tsong (34) führt dies zu einer biphasischen Kinetik der Denaturierung. Der erste Prozess ist eine schnelle Verschiebung innerhalb des Minimums, der zweite charakterisiert das langsame Passieren der Aktivierungsschwelle, die zur Dissoziation führt. Erste kinetische Messungen mit Pyruvatkinase zeigen ein solches Verhalten.

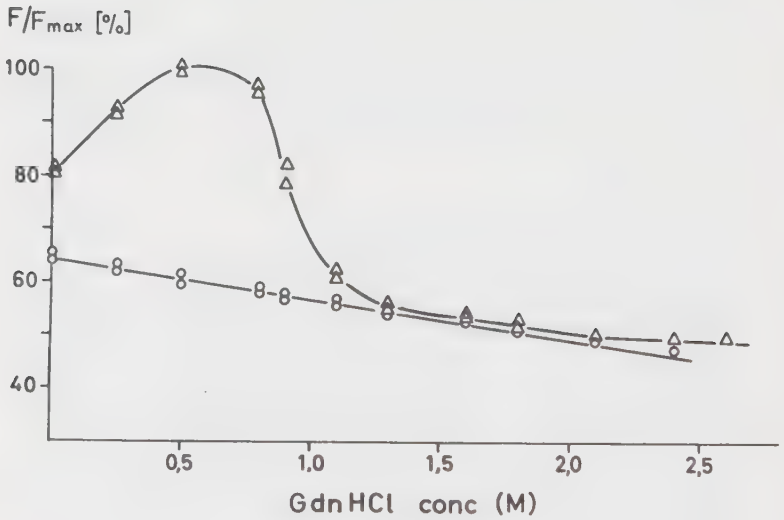


Abb. 9

Relative Fluoreszenzintensität bei 340 nm (Anregung 290 nm) von Muskelpyruvatkinase in Trispuffer (Δ) und Glycerinphosphatpuffer (o) bei 5°C.

Die doppelt eingezeichneten Werte beziehen sich auf Messungen nach einer und nach 24 Stunden.

1.5 Enzymaktivität

Messungen der Enzymaktivität müssen bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen (10 µg/ml) durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind deshalb nicht direkt mit den anderen Meßwerten zu vergleichen, die bei etwa 1 mg/ml gewonnen wurden, da Assoziations-Dissoziationsgleichgewichte von der Proteinkonzentration abhängen. Unter speziellen Bedingungen läßt sich dennoch eine Aussage machen.

Niedrige Konzentrationen verlangsamen Reassoziationsraten, tiefe Temperaturen verlangsamen Konformationsumwandlungen: 1 mg/ml Pyruvatkinase wurde deshalb bei der entsprechenden Guanidin oder Harnstoffkonzentration inkubiert und dann mit reinem Puffer bei 5°C auf 10 µg/ml verdünnt. Diese Prozedur dauerte einige Sekunden, die Aktivitätsmessung in gekoppelten Test dauerte ein bis zwei Minuten. Während dieser Zeit wurde keine Reaktivierung gemessen. Die Abb. (7,10) zeigen, daß sowohl in Guanidin als auch in Harnstoff Inaktivierung und Dissoziation des Tetramers parallel laufen. Dies schließt eine Reaktivierung durch Assoziation während der Meßzeit aus.

Obwohl aktive Konformationen des Dimers, die in sehr kleinen Konzentrationen vorkommen, nicht ausgeschlossen werden können, ist klar, daß das stabile Dimer bei den verwendeten Pufferbedingungen nicht aktiv ist. Eine weitere Klärung des Problems ist von kinetischen Messungen zu erwarten.

Die mit Hilfe der pH-Statn bestimmte Enzymaktivität führt zu einem anderen Ergebnis (Abb. 10). Im Unterschied zum gekoppelten Test wurde hier bei aktuellen Guanidinkonzentrationen ohne Verdünnungsschritt gemessen.

Die Enzymaktivität fällt schon bei kleinen Guanidinkonzentrationen kontinuierlich ab. Für die Interpretation ist hier wieder zu berücksichtigen, daß mit einer Proteinkon-

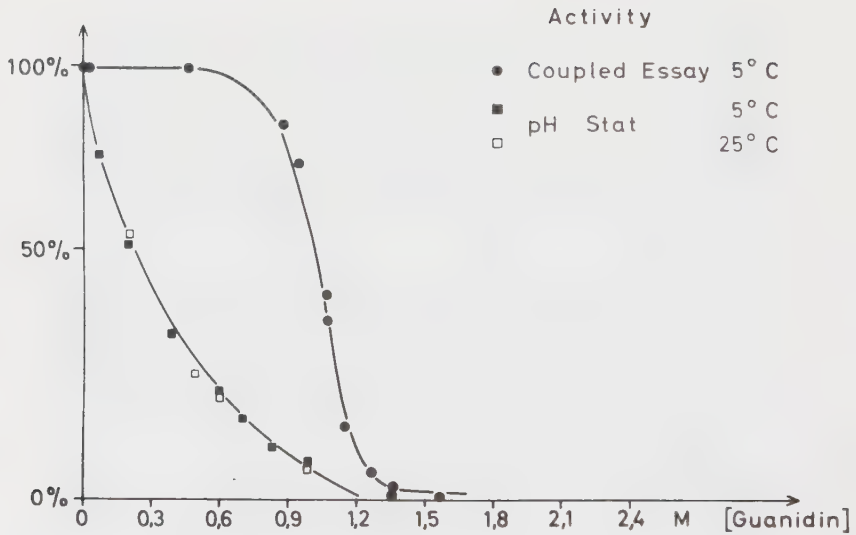


Abb. 10

Enzymaktivität von Muskelpyruvatkinase im gekoppelten Test unmittelbar nach Verdünnung aus der Guanidinlösung bei 5°C (●) und Messungen mit dem pH-Staten bei aktueller Guanidinkonzentration (□, ■).

zentration von 5 μ g/ml gearbeitet wurde, während die Resultate der Lichtstreuung bei 1 mg/ml gewonnen wurden. Da Assoziations-Dissoziationsgleichgewichte stark von der Proteinkonzentration abhängen, muß man schließen, daß die Dissoziation bei abnehmender Proteinkonzentration zu kleineren Guanidinkonzentrationen hin verschoben wird. Dies ist ein erneuter Hinweis darauf, daß der Verlust der Enzymaktivität mit der Dissoziation des Tetramers gekoppelt ist.

2. Hefepyruvatkinase

Abb. (11) zeigt die Resultate der Laserlichtstreuung an Hefepyruvatkinase in Tris-Puffer. Das Protein ist im Gegensatz zum Muskelenzym in diesem Puffer nicht stabil gegen Aggregation. Die Meßwerte konnten nur gewonnen werden, da die Meßzeit kurz war im Vergleich zur Halbwertszeit der Aggregation. Das Enzym ist unter diesen Bedingungen kältelabil (37).

Auch dissoziiert die Hefepyruvatkinase schon bei niedrigen Guanidinkonzentrationen. Die Übergänge sind nicht so scharf wie beim Muskelenzym. Es fehlt das ausgeprägte Plateau, das für ein stabiles Dimer charakteristisch ist. Wie beim Muskelenzym ist die Dissoziation des Tetramers mit einer Auffaltung verbunden, da der Stokesradius in diesem Bereich stark zunimmt.

Zugabe von Glycerin stabilisiert das Protein. Abb.(12) zeigt eine Intensitätsmessung und zum Vergleich die Dissoziationskurve der Muskelpyruvatkinase in Glycerinphosphatpuffer. Bis etwa 1M Guanidin ist das Tetramer stabil.

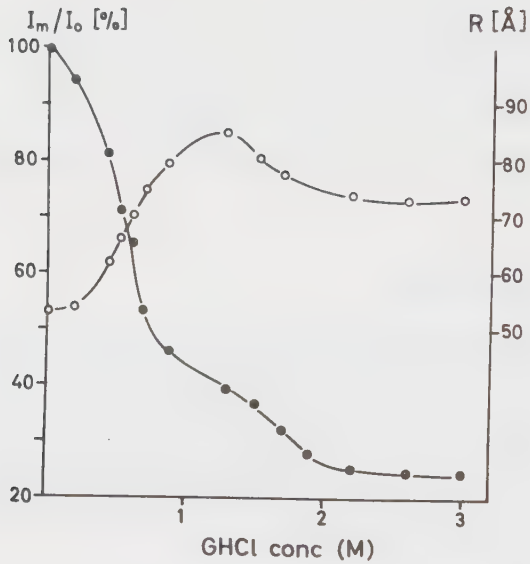


Abb. 11

Relative Streuintensität (●) und hydrodynamischer Radius (○) von Hefepyruvatkinase in Trispuffer, pH 7 und 5°C. Die Meßwerte wurden 30 min nach Inkubation mit Guanidin gewonnen. Nach dieser Zeit ist die Dissoziation abgeschlossen und eine langsame Aggregation setzt ein.

Zwischen 1M und 1.8M Guanidin dissoziiert das Protein und aggregiert sofort, so daß keine Meßwerte gewonnen werden konnten. Ab 1.8M Guanidin ist die Lösung wieder stabil gegen Aggregation, man sieht einen weichen Übergang vom Dimer zum Monomer.

Vergleicht man die Dissoziationskurven beider Enzyme unter diesen Bedingungen, dann besteht außer der Aggregation der wesentliche Unterschied in der Lage und Schärfe des zweiten Übergangs.

Die Unterschiede der Dissoziationskurven deuten auf eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung. Die Hefepyruvatkinase sollte mehr hydrophobe Gruppen enthalten. Nach dem Modell von Kanehisa und Ikegami ist die Schärfe des Übergangs ein Maß für den hydrophoben Charakter eines Proteins (34).

Die Untersuchung der Kälteinaktivierung von Hefepyruvatkinase von Kuczenski und Suelter (38) führt ebenfalls zu dem Schluß, daß das Enzym in zwei Schritten dissoziiert. Das Intermediat ist ebenfalls ein partiell aufgefaltetes Dimer. Eine Zugabe des allosterischen Aktivators Fructosediphosphat destabilisiert das Protein weiter.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Auffaltung der Hefe und Muskelpyruvatkinase einem gemeinsamen Schema folgt, dem möglicherweise auch ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegt. Unterschiede gibt es bei der Stabilität der Proteine. Das Muskelenzym ist zum Beispiel nicht kältelabil.

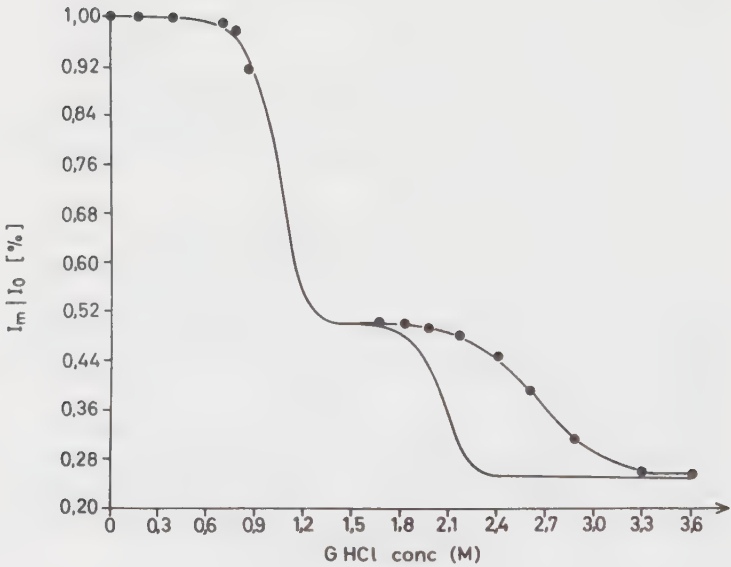


Abb. 12

Relative Streuintensität (●) von Hefepyruvatkinase in Glycerinphosphatpuffer, pH 6.5 und 5°C.

(—) Theoretische Kurve von Hefe- und Muskelpyruvatkinase berechnet nach Modell (30).

V THERMODYNAMISCHES MODELL

1. Theorie

Eine thermodynamische Analyse der Strukturumwandlungen setzt einige Kenntnisse über den Mechanismus der Denaturierung voraus:

Zahl und Eigenschaften der thermodynamischen Zustände, die in meßbaren Konzentrationen vorkommen, müssen bekannt sein (39). Die Daten, die mit Hilfe der Lichtstreuung gewonnen wurden, können unter folgenden Voraussetzungen quantitativ interpretiert werden: Es existiert ein Gleichgewicht von 5 Zuständen:



A_4 und A_4^+ repräsentieren das Tetramer. A_4^+ ist der durch das Fluoreszenzsignal definierte veränderte Zustand des Tetramers. Das kompakte Dimer A_2 wird mitbetrachtet, da seine Existenz auch aus Sedimentationsdaten von Deal u.a. (24) und aus ersten kinetischen Messungen folgt. Die Expansion ist eine Folge der Dissoziation. A_2^+ ist das expandierte Dimer und A_1 symbolisiert das strukturelose Monomer.

Weiter wurde angenommen, daß der Auffaltungsschritt $A_2 - A_2^+$ durch einen Zweizustandsprozess angenähert werden kann. Die Schärfe der Übergangskurve und die Sedimentationsdaten von Deal u.a. (24), die nur zwei Intermediate zeigen sprechen für diese Annahme.

Die Gleichgewichtskonstanten und Änderungen des chemischen Potentials erhält man aus den Daten der Lichtstreuung wie folgt:

Das Intensitätsverhältnis I_m/I_o ist ein Mittelwert über die vier Zustände $i = 1...4$:

$$I_m/I_o = K \frac{\sum C_i M_i^2}{C_o M_o^2} = K \frac{M_w}{M_o} \quad (31)$$

K ist die optische Konstante, C_i ist die molare Konzentration von Spezies i.

Bei der quasielastischen Lichtstreuung mißt man das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten:

$$D_z = \sum C_i M_i^2 D_i / \sum C_i M_i^2 \quad (32)$$

Für den Radius gilt dann:

$$\frac{1}{R} = \sum \frac{C_i M_i^2}{R_i} / \sum C_i M_i^2 \quad (33)$$

Die Gleichgewichtskonstanten ergeben sich aus den molaren Konzentrationen:

$$K_1 = C_2^2/C_4^+, \quad K_2 = C_2/C_2^+, \quad K_3 = C_1^2/C_2^+ \quad (34)$$

Die Änderung des chemischen Potentials des Übergangs 1 ist verknüpft mit der Gleichgewichtskonstante K_1 durch die Gleichung:

$$\Delta\mu^1 = - RT \ln K_1 \quad (35)$$

$\Delta\mu^1$ und K_1 sind Funktionen der Guanidin- oder Harnstoffkonzentration. Um ein Maß für die Stabilität des Proteins unter physiologischen Bedingungen zu erhalten, ist eine Extrapolation erforderlich. Da der Mechanismus der Wirkung von Guanidin und Harnstoff nicht genau bekannt ist, folgen wir einer vom Mechanismus unabhängigen thermody-

namischen Beschreibung, die kürzlich von Schellman entwickelt wurde (40):

Das chemische Potential einer Komponente j in Lösung kann auf einer molaren Basis wie folgt geschrieben werden:

$$\mu_j = \mu_j^{\circ} + RT \ln C_j + RT b_j \quad (36)$$

Speziell wird eine Lösung aus drei Komponenten betrachtet. Die Indizes werden nach Konvention definiert:

- $j = 1$ prinzipielles Lösungsmittel,
- $j = 2$ Protein
- $j = 3$ Guanidin, Harnstoff

μ_j° , C_j , $RT b_j$ sind das chemische Potential des Referenzzustandes, die Molarität und die Überschußenergie der Komponente j . Die Differenz des chemischen Potentials zwischen zwei Zuständen des Makromoleküls ist dann gegeben durch:

$$\Delta\mu_2 = \Delta\mu_2^{\circ} + RT \Delta b_2^{\circ} \quad (37)$$

Der Index^o gibt an, daß Gleichung (37) im Grenzfall verschwindender Konzentration C_2 gilt. $\Delta\mu_2^{\circ}$ ist die gesuchte Änderung des chemischen Potentials in Abwesenheit von Komponente 3.

Die Überschußenergie $RT b_j$ kann in eine Taylorreihe nach allen Konzentrationen gelöster Komponenten entwickelt werden:

$$b_j^{\circ} = b_{jk}^{\circ} C_k + b_{jkn}^{\circ} C_k C_n + \dots \quad (38)$$

Die partiellen Ableitungen b_{jk}° , b_{jkn}° sind im Grenzfall verschwindender Konzentrationen C_j zu bilden.

Mit Schellman betrachten wir jetzt ein Modell, in dem speziell und nur b_2° linear ist in der Konzentration

von Komponente 3. Für niedrige Konzentrationen von 2 folgt:

$$b_2^0 = b_{23}^0 C_3 \quad (39)$$

Die Differenz des chemischen Potentials zwischen zwei Zuständen des Makromoleküls ist dann:

$$\Delta\mu_2 = \Delta\mu_2^0 + RT \Delta b_{23}^0 C_3 \quad (40)$$

Trotz seiner Einfachheit beschreibt das lineare Modell das Verhalten einer ganzen Reihe von Proteinen (26,35, 41-44). Die Selbstkonsistenz des Modells kann gezeigt werden, wenn verschiedene Komponenten 3 bei Extrapolation $C_3 \rightarrow 0$ dasselbe $\Delta\mu_2^0$ ergeben.

2. Ergebnisse

Diese lineare Prozedur wird verwendet, um die Guanidin- und Harnstoffdenaturierung von Pyruvatkinase zu analysieren. Das Mehrzustandsgleichgewicht, das durch das Proteinmodell (30) definiert ist, erfordert die Lösung eines Polynoms 4. Grades. Dies wurde mit Hilfe einer linearen Regression mit dem Computer durchgeführt. Die Stabilität des Minimums wurde mit verschiedenen Anfangswerten geprüft. Um die Existenz des Zustandes A_2 nachzuweisen, wurden verschiedene Läufe mit und ohne A_2 durchgeführt. Die Abweichungen lagen im Bereich der Messungenauigkeit. Das bedeutet, daß die Stabilität von A_2 kleiner sein muß als 3 kcal/Mol.

In Abb. (7) ist eine theoretische Kurve zu sehen, die diesen Wert verwendet. Die theoretischen Kurven in Abb. (6,7) zeigen, daß das Modell die Meßdaten gut beschreibt. Der optimale Parametersatz ist in Tabelle 2 angegeben.

TABELLE II

Thermodynamische Daten von Pyruvatkinase in

Glycerinphosphatpuffer pH 6.5, T = 5°C

Denaturant	Guanidin		Harnstoff		
Übergang	$\Delta\mu_2^0$	$RT\Delta b_{23}^0$	$\Delta\mu_2^0$	$RT\Delta b_{23}^0$	Konstante
	(kcal/Mol)	(kcal/Mol/M)			Mol/l
Muskelpyruvatkinase					
$A_4^+ - 2A_2^+$	15.9	9.3	16.3	4.7	$2 \cdot 10^{-13}$
$A_2 - A_2^+$	<3		<3		
$A_2^+ - 2A_1$	15.6	4.5			$5 \cdot 10^{-13}$
Hefepyruvatkinase					
$A_2^+ - 2A_1$	15.4	3.6			$7 \cdot 10^{-13}$

Die Werte, die mit Guanidin und Harnstoff an Muskelpyruvatkinase gewonnen wurden, sind im Rahmen des Meßfehlers konsistent. Die Stabilität des Tetramers von 16 kcal/Mol ist vergleichbar mit der von Desoxihämoglobin (14 kcal/Mol) (55). Die Dissoziationskonstante von 10^{-13} Molar und die geringe Stabilität des kompakten Dimers machen eine funktionelle Bedeutung dieses Übergangs unwahrscheinlich. Unter physiologischen Bedingungen ist das Enzym nicht dissoziiert.

Hefepyruvatkinase ist in glycerinfreiem Puffer nicht stabil gegen Aggregation. Deshalb wurde keine thermodynamische Analyse vorgenommen. In Glycerinphosphatpuffer ist jedoch der Dimer-Monomer Übergang stabil gegen Aggregation und konnte ausgewertet werden.

Während die Stabilisierungsenergien beider Proteine in Glycerinphosphatpuffer recht ähnlich sind, gibt es Unterschiede bei den Effizienzparametern Δb_{23}^0 . b_{23} ist der Virialkoeffizient der Wechselwirkung zwischen Molekül 2 und 3:

$$b_{23} = \int \int (1 - \exp(-w_{23}/RT)) \, dV d\Omega \quad (41)$$

w_{23} ist das Potential der Kräfte zwischen Molekül 2 und 3. Das Integral erstreckt sich über alle Positionen in V und Orientierungen Ω von Molekül 3 relativ zu Molekül 2. Für Kräfte mit kurzer Reichweite kann Δb_{23} näherungsweise beschrieben werden:

$$RT\Delta b_{23} = \Delta A \, d\overline{w}_{23} \quad (42)$$

ΔA ist die von Richards (45) definierte Änderung der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche bei der Auffaltung des Proteins. ΔA ist eine Funktion der Kompakteinheit und des Molekulargewichts des Proteins. Da Proteine ähnlich kompakt sind, konnten Chothia und Teller zeigen

(46,47) daß ΔA eine einfache ansteigende Funktion des Molekulargewichtes ist (43).

$\overline{w}_{23}$ hängt von der Komponente 3 und der Aminosäurezusammensetzung des Proteins ab. Dies erklärt, daß der Dimer-Monomer Übergang wegen des kleineren Molekulargewichts einen kleineren Effizienzparameter Δb_{23}^O hat als Tetramer-Dimer Übergang. Der Wert von $\Delta b_{23}^O = 4.65 \text{ kcal/mol} \times M$ pro Dimer (Molekulargewicht 120 000 D) ist relativ klein. Zum Vergleich: α -Chymotrypsin mit einem Molekulargewicht von 25 000 D hat 4.1 (41) und Phosphoglyceratkinase hat mit einem Molekulargewicht von 45 000 D hat einen Wert von 5.8 (57).

Das ist verständlich, wenn die beiden Untereinheiten des Dimers bei der Dissoziation des Tetramers unabhängig voneinander auffalten (56). Hinzu kommt, wie die Messungen zeigen, daß bei der Dissoziation des Tetramers möglicherweise nur ein Teil einer Untereinheit, eine Domäne, aufaltet. Dies wird im folgenden Kapitel diskutiert.

Die Unterschiede von Δb_{23}^O bei der Dissoziation des Dimers zwischen Muskel- und Hefepyruvatkinase kann zwei Ursachen haben:

Unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung und damit verschiedene $\overline{w}_{23}$ oder einen Unterschied im Molekulargewicht der von der Dissoziation betroffenen Proteindomänen.

Einen weiteren Hinweis auf den Charakter der stabilisierenden Kräfte gibt das Verhältnis der Effizienzparameter von Guanidin und Harnstoff: $\Delta b_{23}^G / \Delta b_{23}^H$: Guanidinhydrochlorid ist ionisch, Harnstoff nicht. Der Wert für Muskel-Pyruvatkinase (1.98) ist vergleichbar mit dem von Proteinen, die hauptsächlich durch hydrophobe Kontakte stabilisiert werden (41):

Lysozyme (1.68), Lactoglobulin (1.84), α -Chymotrypsin (1.98). Polare Proteine wie z.B. Ribonuklease (2.82) haben höhere Werte.

VI ZUSAMMENHANG ZWISCHEN STRUKTUR UND STRUKTURUMWANDLUNGEN

Die Denaturierungsexperimente an Pyruvatkinase zeigen, daß der Übergang von der nativen zur strukturlosen Einheit in zwei Schritten erfolgt. Das stabile Intermediat wurde als partiell aufgefaltetes Dimer identifiziert. Zwei mögliche Erklärungen sind denkbar:

Die verschiedenen strukturellen Ebenen der Proteinorganisation fallen sequenziell auf. Die Alternative ist: Das Protein ist nicht homogen und besteht aus Domänen mit unterschiedlicher Stabilität.

Die erste Möglichkeit kann durch die beschriebenen Experimente ausgeschlossen werden, da die Änderungen der Quarternär-, Tertiär- und Sekundärstruktur parallel verlaufen.

Inhomogenitäten der Proteinstruktur werden allein schon durch das Lösungsmittel erzeugt: Polare Gruppen befinden sich bevorzugt an der Oberfläche, während die hydrophoben Gruppen hauptsächlich im kompakten Kern vorkommen. Der Begriff "Domäne" resultiert aber aus der Beobachtung, daß größere monomere Proteine aus zwei und mehr Kernen bestehen.

Wetlaufer (48) und Ptitsyn (49) führen dies auf den Mechanismus der Faltung zurück: Bei der Strukturbildung eines Proteins entstehen zunächst mehrere unabhängige Keime, die Faltungsdomänen bilden und in einem späteren Stadium kondensieren. Der Begriff "Domäne" hat nicht nur eine geometrische, sondern auch eine energetische Bedeutung. Er impliziert, daß die Wechselwirkungen innerhalb einer Domäne stärker sind als die zwischen verschiedenen Domänen.

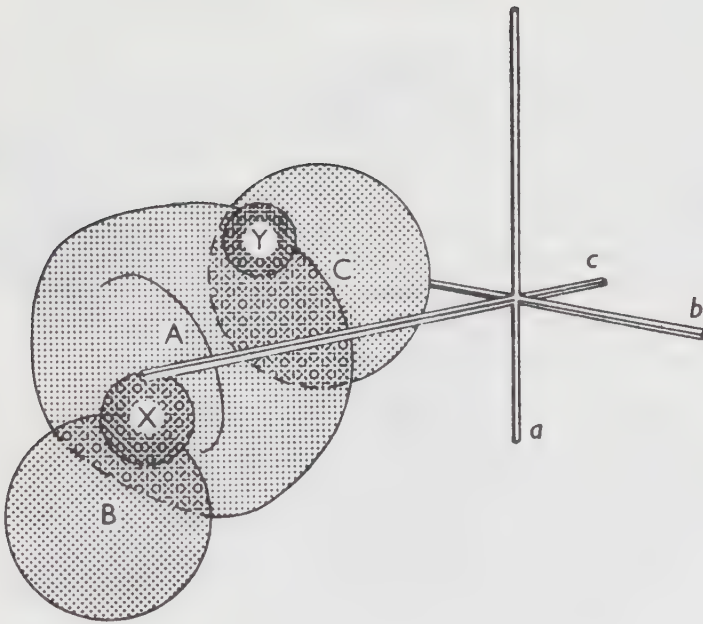


Abb. 13

Schematische Domänenstruktur von Katzen-Muskelpyruvatkinase (52), Domäne A enthält das aktive Zentrum X und eine zweite ADP-Bindungsstelle Y. Es ist nur eine Untereinheit gezeigt. Die Untereinheiten liegen an den Scheiteln eines Tetraeders. Die zwei Bindungsflächen liegen entlang der c und b- Dyade.

Die NMR-Messungen von Wüthrich u.a. belegen dies für den Trypsininhibitor (50).

Bei α -Laktalbumin wird bei der Denaturierung ein Intermediat festgestellt, das noch helicale Strukturen enthält (51). Eine unabhängige Auffaltung von Domänen wurde bei Immunglobulin LC (56) und Phosphoglyceratkinase (57) nachgewiesen. Jedoch ist die Stabilität von isolierten Domänen in monomeren Proteinen gewöhnlich gering. Bei oligomeren Enzymen können Bereiche von verschiedenen Untereinheiten zu stabilen Domänen assoziieren. Diese Stabilität mag zumindest in einigen Fällen für eine unabhängige Auffaltung von Domänen innerhalb einer Untereinheit ausreichen.

Unter diesem Aspekt vergleichen wir die Meßergebnisse mit Röntgenstrukturdaten von Katzenmuskelpyruvatkinase (52). Die Kristalle des Kaninchenmuskelenzyms sind für eine Röntgenanalyse zu ungeordnet. Beide Enzyme haben gleiches Molekulargewicht und gleiche kinetische Eigenschaften. Es ist deshalb sinnvoll anzunehmen, daß zumindest die Grobstruktur beider Enzyme übereinstimmt.

Die vier identischen Untereinheiten sind an den Scheiteln eines Tetraeders um eine zweizählige Symmetrieschse angeordnet. Jede Untereinheit ist, wie Abb. (13) schematisch zeigt, aus drei Domänen unterschiedlicher Größe aufgebaut.

Die kleinste Domäne B mit der niedrigsten Elektronendichte ist flexibel und besteht hauptsächlich aus β -Strukturen (Abb. 14).

Die größte Domäne A enthält das aktive Zentrum X, eine zweite ADP-Bindungsstelle Y und liefert die Kontaktfläche für Untereinheiten, die entlang der b-Achse (Z)

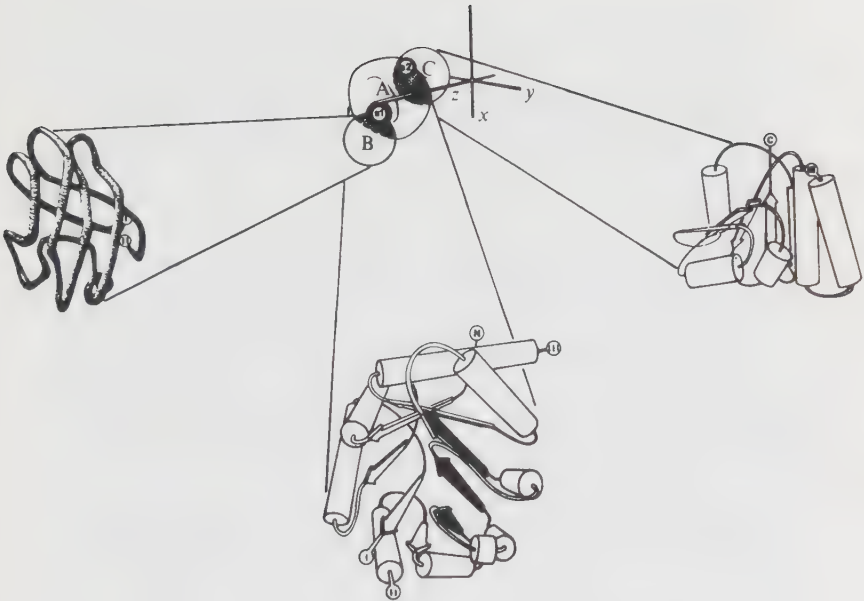


Abb. 14

Sekundärstruktur der Domänen A, B und C (52).
Die Zylinder stellen Helices, die Pfeile Faltblattstrukturen dar. Die Verbindungen sind relativ ungeordnete Kettenstücke. Domäne B besteht hauptsächlich aus Faltblattstrukturen, deren Verbindungen wegen der Flexibilität der Domäne unsicher sind.

gebunden sind. Sie besteht aus hochgeordneter α/β -Struktur. Die kleinere Domäne C enthält ebenfalls α/β -Sequenzen und liefert die zweite Bindungsfläche. Im Kontaktbereich entlang der kristallographischen C-Achse (Y) sind 2 α -Helices und eine β -Einheit dicht gegen die äquivalente Struktur der anderen Untereinheit gepackt, so daß ein Strukturkontinuum entsteht.

Da die Domäne B locker gepackt ist und keine Helixstruktur enthält, wird sie bei der Auffaltung weder zum Stokesradius noch zum CD-Signal einen großen Beitrag leisten. Die Fluoreszenz einer Tryptophangruppe in dieser Domäne müßte empfindlich sein gegenüber Veränderungen des Lösungsmittels. Genauere Aussagen können erst nach der Bestimmung der Sequenz gemacht werden.

Die Expansion des Moleküls und der Verlust des größten Teils des Helixgehaltes und der Enzymaktivität bei der Dissoziation des Tetramers legt die Folgerung nahe, daß die größte Domäne A von diesem Prozess betroffen ist. Andererseits bleibt ein Restgehalt an helicaler Struktur, der erst bei der Dissoziation des Dimers verloren geht. Dieser Prozess kann dann der Domäne C zugeschrieben werden.

Die Möglichkeit, daß thermodynamische und kristallographische Domänen verschieden sind, kann nicht ausgeschlossen werden. Dies setzt allerdings die Stabilität von einzelnen, nicht in eine Überstruktur eingebetteten, Helices voraus. Angesichts der Kopplung von Dissoziation und Faltung erscheint diese Möglichkeit wenig wahrscheinlich.

Das Tetramer Pyruvatkinase ist durch die verschiedenen Bindungsenergien ein Dimer aus identischen Dimeren.

Ein Beispiel für die physiologische Bedeutung einer solchen Struktur liefert das allosterische Tetramer Hämoglobin:

Beim allosterischen Konformationsübergang von der R- zur T-Struktur bewegen sich die α/β -Dimere wie starre Körper relativ zueinander (53). Chothia, Wodak und Janin (54) zeigten, daß die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche in den Kontaktflächen der Untereinheiten in Desoxyhämoglobin und Methämoglobin unterschiedlich ist. In beiden Molekülen sind die Dimer-Dimer Kontaktflächen dicht gepackt. Das führt zu dem Schluß, daß die hydrophobe Wechselwirkung die Desoxystruktur stabilisiert. Die freie Energie, die notwendig ist, um die Untereinheiten in einem Zustand niedriger Affinität zu halten, wird kompensiert durch die hydrophobe Energie einer kleineren freien Oberfläche. Beim Übergang von Desoxyhämoglobin zu Oxyhämoglobin nimmt die Bindungsenergie der Dimere von 14 kcal/Mol auf 8 kcal/Mol ab (55).

Nach diesem Konzept müßten allosterische Effektoren die Stabilität und Bindungsenergie der Untereinheiten eines allosterischen Enzyms beeinflussen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Dissoziationsexperimente liefern ein Maß für die Stabilität und die Änderung der freien Oberfläche ΔA von Pyruvatkinase.

In der Tat wurde bei Hefepyruvatkinase festgestellt (37), daß der allosterische Aktivator FDP die Kälteabilität erhöht.

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde auch bei Muskelpyruvatkinase eine FDP-Aktivierbarkeit festgestellt und eine sigmoide Kinetik gemessen (13).

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen deshalb eine systematische Untersuchung der Wirkung von Effektoren auf die Übergangscharakteristik nahe. Dies würde auch zur weiteren Klärung der Domänenhypothese beitragen.

Ein weiteres Projekt, daß im Anschluß an diese Arbeit begonnen wurde, ist die Kinetik der Denaturierung von Pyruvatkinase, um zum Beispiel Eigenschaften des kompakten Dimers zu untersuchen.

VII ZUSAMMENFASSUNG

Am oligomeren Enzym Pyruvatkinase wurden strukturelle Übergänge vom nativen hochgeordneten zum vollständig ungeordneten Zustand untersucht. Induziert wurden die Übergänge durch Guanidinhydrochlorid und Harnstoff. Die Strukturveränderungen umfassen verschiedene Ebenen der Organisation: Sekundär-Tertiär und Quartenärstruktur. Dementsprechend war es notwendig, eine Kombination von Meßmethoden zu verwenden, die dieser Hierarchie zugeordnet werden kann:

Elastische und quasielastische Lichtstreuung liefern globale Parameter, die Veränderungen des Molekulargewichts und des molekularen Radius wiedergeben. Lokale Parameter erhält man durch Messung des Zirkulardichroismus und des Fluoreszenzspektrums, die Aufschluß geben über den Helixgehalt des Moleküls und die lokale Umgebung von Tryptophangruppen. Die Veränderung dieser Parameter wurde verglichen mit der Enzymaktivität, um einen Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion zu finden. Die Meßdaten, die mit Hilfe dieser Methoden gewonnen wurden, erlauben die Identifikation einer Reihe von Zwischenzuständen zwischen "nativem" und "denaturiertem" Zustand.

Der native Zustand ist definiert durch die Röntgenstruktur des Moleküls, die bekannt ist. Der ungeordnete Zustand kann durch ein "Gaußknäuel" beschrieben werden. Mit wachsender Konzentration von Guanidinhydrochlorid treten folgende Strukturveränderungen auf: Der erste Schritt ist eine lokale Konformationsumwandlung, die nur zu einem Ansteigen des Fluoreszenzsignals führt, die übrigen Parameter aber unverändert läßt. Der nächste Schritt ist eine Dissoziation des Tetramers in kompakte Dimere, die zu einer Verminderung der

mittleren Intensität der Lichtstreuung um 50% führt. Diese kompakte Form ist sehr instabil und kommt bei Gleichgewichtsmessungen nur in geringen Konzentrationen vor. Das Gleichgewicht liegt sehr stark bei einer partiell aufgefalteten dimeren Form, die durch einen vergrößerten Stokesradius und einen stark verminderten Helixgehalt charakterisiert ist. Im Laufe dieses Übergangs verliert das Enzym seine Aktivität. Bei noch höheren Guanidinkonzentrationen dissoziiert das Dimer in praktisch strukturlose Monomere. Mit Hilfe der Laserlichtstreuung lassen sich die Übergangskurven so genau messen, daß man sie anhand eines thermodynamischen Modells analysieren kann und ein Maß für die Stabilität des Proteins erhält. Die Stabilisierungsenergie der nativen Struktur des Proteins liegt bei 16 kcal/Mol. Hefe- und Muskelpyruvatkinase haben eine ähnliche Übergangscharakteristik.

Das Ergebnis, daß das Protein in mehreren Schritten seine Struktur verliert, kann auf zwei Arten erklärt werden. Die erste Möglichkeit ist, daß sich verschiedene Ebenen der Strukturhierarchie sequentiell verändern. Dies wird nicht beobachtet. Viel wahrscheinlicher ist, daß das Protein nicht homogen organisiert, sondern aus verschiedenen Domänen aufgebaut ist. Abgesehen von den Superdomänen, den 4 Untereinheiten, zeigt die Röntgenstruktur, daß jede Untereinheit für sich aus drei Domänen besteht. Je zwei dieser Domänen sind an der Bindung benachbarter Untereinheiten beteiligt. Die Tatsache, daß diese zwei Domänen unterschiedliche Größe haben, erlaubt einen Vergleich mit den beschriebenen Messungen. Da im Bereich der Dimerauffaltung der Stokesradius drastisch ansteigt und ein großer Teil des Helixgehaltes verloren geht, während im Bereich der Dimer-Monomerdissoziation eine weitere, aber kleinere Abnahme des Helixgehaltes registriert wird, liegt es nahe anzunehmen, daß die größere Domäne zuerst auffaltet.

Diese Vorstellung ist komplementär zu der oft diskutierten Hypothese, daß der Faltungsmechanismus eines Proteins vom ungeordneten Zustand zunächst einzelne Domänen umfasst, die in einem späteren Stadium kondensieren.

Literaturverzeichnis

- (1) K.Wüthrich, NMR in Biological Research
North Holland, Amsterdam(1976).
- (2) J.A.Mc Cammon, B.R.Gelin, M.Karplus,
Nature 267,585(1977).
- (3) B.Chu, Laser Light Scattering,
Academic Press, New York(1974).
- (4) R.N.Pusey, D.E.Koppel, D.W.Schaefer,
R.D. Camerini Otero
Biochemistry 13,5(1974)957-960.
- (5) L.De Maeyer, K.Gnädig, J.Hendrix, B.Saleh,
Zu. Rev. Biophys. 9,1(1976)83-107.
- (6) V.A.Bloomfield, J.A.Benbasat,
Macromolecules 4,5(1971),609-613.
- (7) E.E.Uzgiris, D.C.Golibersuch
Phys. Rev. Let. 32,2(1974)37-40.
- (8) D.D.Haas, R.V.Mustacich, B.A.Smith,
B.R.Ware.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 59,1(1974)
174-180.
- (9) S.B.Dubin, G.Feher,G.B.Benedek,
Biochemistry,12,4(1973)714-720.
- (10) D.F.Nicoli, G.B.Benedek,
Biopolymers, 15(1976)2421-2437.
- (11) B.Hess in Energy Transformation in Biological
Systems (1975) Ciba Foundation Symposium 31.
- (12) B.Hess, K.J.Johannes, C.Kutzbach,
H.P.Bischofberger, C.J.Barwell, P.Röschlau
in Mechanisme and Control Properties
Akademie Verlag, Berlin (1971).
- (13) F.C.Phillips, S.Ainsworth
Int. J. Biochem. (1977),8,729-735.
- (14) G.L.Cottam, P.F.Hollenberg, M.Y.Coon,
J. Biol. Chem. (1969)244,1481-1486.
- (15) G.S.Johnson, M.Steinmetz Kayne,
W.C.Deal,
Biochemistry (1969),8,2455-2462.
- (16) M.Tobes, R.T.Kuczenski, C.H.Suelter,
Arch. Bioch. Biophy. 151,56-61(1972).

- (17) B.Hess, L.Bornmann in *Metabolic Interconversion of Enzymes* (1974) 361-367
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- (18) D.K.Stammers, H.Muirhead
J.Mol. Biol. (1975) 95, 213-225.
- (19) E.F.Cassasa, H.Eisenberg
Advances in Prot. Chem. (1964) 19, 287-395.
- (20) E.Jakeman in *Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy*. Plenum Press (1974) New York.
- (21) C.J.Oliver in *Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy*, Plenum Press (1974) New York.
- (22) M.Kapoor, T.M.Tronsgaard
FEBS Lett. (1972) 23, 3, 349-351.
- (23) Ch. Tanford in *Physical Chemistry of Macromolecules* (1961) John Wiley, New York.
- (24) M.A.Steinmetz, W.C.Deal
Biochem. 5, 4 (1966) 1399-1405.
- (25) J.Monod, J.Wyman, J.P.Changeux
J.Mol. Biol. (1965) 12, 88-118.
- (26) Herskovits, T.T., George, R.C.S., Cavanagh, S.M. (1978) J.Col. Int. Sci. 63, 2, 226-234.
- (27) Parr, G.R., Hammes, G.G. (1975)
Biochemistry, Vol. 14, 8, 1600-1605.
- (28) Rudolph, R., Heider, J., Westhof, E. Jaenicke, R. (1977) Biochemistry, 16, 38840-3390.
- (29) Rudolph, R., Haselbeck, A., Knorr, F. Jaenicke, R. (1978) in print.
- (30) F.Richards, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 6 (1977) 151-176.
- (31) H.A.Scheraga in *Protein Structure* (1961) Academic Press, New York and London, S.1-10.
- (32) S.P.Rao, D.E.Carlstrom, W.G.Miller
Biochemistry 13, 5 (1974) S.34-952.
- (33) J.Randall, D.Starling, J.P.Baldwin, K.Ibel. *The Scattering of Neutrons by Catalase*. Brookhaven, Symp. Biol. 27, 4 (1975) 78-96.

- (34) M.I.Kanehisa, T.J.Tsong (1978)
J.Mol. Bio. 124,177-194.
- (35) M.I.Kanehisa, A.Ikegami
Biophys. Chem. 6(1977)131-149.
- (36) J.Gerschitz, R.Rudolph, R.Jaenicke
Biophys. Struc. Mech. (1977),3,291-302.
- (37) R.T.Kuczenski, C.H.Suelter
Biochem. 9,1970) 939-945.
- (38) R.T.Kuczenski, C.H.Suelter
Biochemistry(1971)10,15,2867-2872.
- (39) J.F.Brandts in Structure and Stability
of Biological Macromolecules
Marcel Dekker (1969) Ed. by S.N.Timasheff,
G.D.Fasman.
- (40) J.A.Schellman, Biopolymers, 17(1978)
1305-1322.
- (41) R.F.Greene, N.Pace (1974)
J.Biol. Chem. 249,17,5388-5393.
- (42) S.Maruyama, K.Kuwajima, K.Nitta,
S.Sugai (1977) Biochim. Biophys. Act.
494,343-353.
- (43) Th.T.Herskovits, J.P.Harrington,
Biochemistry 14,22(1975) 4964-4976.
- (44) F.Ahmad. P.Mc Phie,
Biochemistry, 17,N2(1978)241-246.
- (45) F.Richards, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 6
(1977) 151-176.
- (46) C.Chothia, Nature(1975)254,304-308.
- (47) D.C.Teller, Nature(1976)260,729-731.
- (48) D.B.Wetlaufer,Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 70,3,697-701(1973).
- (49) D.B.Ptitsyn, FEBS Lett. Vol. 93,N1(1978)
1-4.
- (50) K.Wüthrich, G.Wagner, Dynamic Aspects
of Protein Conformation Studied by
Nuclear Magnetic Resonance: Evidence
for Hydrophobic Stability Domains in
Globular Proteins, Proc. Int. Symp. on
Biomolecular Structure, Conformation, Formation
and Evolution, Madras, India, in press.

- (51) K.Kuwajima (1977) J.Mol. Bio. 114,
241-258.
- (52) Levine,M., Muirhead,H., Stammers,D.K.
Stuart,D.I.(1978) Nature, Vol.271,626-630.
- (53) Muirhead,H., Cox,J.M.Mazzarella, Perutz,M.F.
(1967) J.Mol. Biol. 117-156.
- (54) C.Chothia, S.Wodak, J.Janin,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA,73,11(1976)
3793-3797.
- (55) F.C.Mills, G.K.Ackers (1978) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, Vol. 76,N1,273-277.
- (56) Rowe,E.S., Tanford,C.(1973) Biochem. 12,4822-4827.
- (57) Burgess,R.J., Pain,R.H.(1977) Biochem. Soc. Trans. 5,
692-694.

Dank

Herrn Professor Dr. B. Hess danke ich für die Anregung und großzügige Unterstützung dieser Arbeit. Bei den vielen praktischen Problemen im Umgang mit Proteinen hat mir Frau Müller viel geholfen.

Herr Dr. Th. Reed hat experimentelle Vorarbeit geleistet und die kinetischen Messungen begonnen. Den Kollegen vom Rechenzentrum, insbesondere Herrn Müller und Herrn Dreher bin ich für ihre Hilfe bei der Computerauswertung dankbar.

Herr Wüster und Frl. Alfsmann haben das Hefeenzym präpariert. Die Zeichnungen stammen aus der Hand von Frau Rahn und Frau Reiher.

Frl. Knaut, Frau Heimlich, Frl. Plettenberg und Frau Wagner danke ich für das Schreiben des Manuskripts (einschließlich der griechischen Buchstaben).

Viele Kollegen und Freunde in Dortmund halfen mir, mein Weltbild gerade zu rücken, wenn es notwendig war, unter anderen: Helmut, Renate, Martin, Verena und Karin.

Der Max-Planck-Gesellschaft (vormals Kaiser Wilhelm Gesellschaft) danke ich für finanzielle Unterstützung.

LEBENS LAUF

6.11.1948 geboren in Stuttgart als Sohn des Karl Doster
und seiner Ehefrau Hilde, geb. Wieland

1954 - 1958 Grundschule in Korntal bei Stuttgart

1958 - 1967 Gymnasium Korntal

1967 Abitur

1967 6-monatige Lehre als Werkzeugmacher

1967 - 1969 Bundeswehr

1969 Physikstudium an der Universität Stuttgart

1971 Geophysikalisches Praktikum in Ankara (Türkei)

1971 Vordiplom in Stuttgart

1972 Physikstudium an der Universität Ulm

1973 - 1975 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für
theoretische Physik I und experimentelle Physik II
(Tutor in Übungsgruppen und im Fortgeschrittenen
Praktikum)

1974 Wahlfachprüfungen in Polymerphysik und Biochemie

1975 Diplomprüfung und Diplomarbeit bei Professor
Pechhold mit dem Thema: "Monte Carlo Simulation
und NMR Verhalten eines Defektmodells der Polymer-
schmelze"

seit April 1976 Wissenschaftlicher Assistent am Max-Planck-
Institut für Ernährungsphysiologie, Dortmund

Offsetdruck
GmbH & Co. KG.

86 Bamberg Hohe-Kreuz-Str. 9b

M. SCHADEL

» Tel. 0951/54414 » 58461 «